

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 039 297 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
27.09.2000 Bulletin 2000/39

(51) Int Cl.7: **G01N 33/50**

(21) Numéro de dépôt: **00400670.6**

(22) Date de dépôt: **10.03.2000**

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Etats d'extension désignés:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorité: **19.03.1999 FR 9903467**

(71) Demandeur: **ABX**
34184 Montpellier Cedex 4 (FR)

(72) Inventeurs:
• **Veriac, Sylvie, Les Jardins d'Alhambra No.7
34000 Montpellier (FR)**
• **Champselx, Henri
34980 Montferrier sur Lez (FR)**

(74) Mandataire: **Bezault, Jean**
Cabinet Netter
40, rue Vignon
75009 Paris (FR)

(54) **Réactif pour la détermination des leucocytes et la mesure de l'hémoglobine dans un échantillon de sang**

(57) L'invention concerne un réactif pour la détermination des leucocytes et la mesure de l'hémoglobine dans un échantillon de sang. Ce réactif comprend un système tampon propre à ajuster sélectivement le pH du réactif à une valeur acide, au moins un détergent de

type cationique, un composé nitro-géné et facultativement au moins un sel inorganique. Ce réactif est utilisable dans les analyses hématologiques en médecine humaine et permet aussi l'identification d'une sous-population leucocytaire, en particulier les polynucléaires basophiles.

Description

[0001] L'invention se rapporte aux analyses hématologiques.

[0002] Elle concerne plus particulièrement un réactif pour la détermination des leucocytes et la mesure de l'hémoglobine dans un échantillon de sang.

[0003] L'invention vise également à procurer un tel réactif qui permet l'identification d'une sous-population leucocytaire, en particulier les polynucléaires basophiles.

[0004] La détermination des leucocytes, en particulier de certaines sous-populations leucocytaires, ainsi que la mesure de la concentration en hémoglobine des érythrocytes ou globules rouges sont très importantes pour le diagnostic en pathologie humaine.

[0005] On rappelle ici que les leucocytes, ou globules blancs humains, sont divisés en cinq sous-populations, à savoir trois sous-populations principales : les lymphocytes, monocytes et polynucléaires ou granulocytes, ces derniers étant eux-mêmes subdivisés en neutrophiles, éosinophiles et basophiles, en fonction des caractéristiques de leurs granules cytoplasmiques.

[0006] La détermination des leucocytes totaux ainsi que l'identification de leurs différentes sous-populations sont réalisées par l'intermédiaire de techniques traditionnelles d'observation microscopique, ou de techniques plus modernes, fondées principalement sur la mesure de variations de résistivité (WO 84/03771) ou la diffraction optique (US 3 740 143) développées pour des appareils automatiques spécifiques.

[0007] Pour l'identification des sous-populations leucocytaires, la numération des granulocytes basophiles est particulièrement délicate étant donné que cette population ne représente, chez un individu sain, que 0,5 % à 1 % de la population leucocytaire totale.

[0008] On observe une augmentation de cette population basophile, qui atteint alors une proportion de 2 à 3 % en poids, lors de réactions allergiques. Parmi les infections, ce sont la tuberculose et la varicelle qui peuvent entraîner une basophilie et, pour les maladies métaboliques, le myxoedème et les hyperlipidémies. Par conséquent, la numération des granulocytes basophiles revêt une importance particulière.

[0009] Le Brevet FR 90 01660 et son équivalent US 5 196 346 décrivent un réactif qui préserve les granulocytes basophiles, de façon à permettre leur détermination par mesure de résistivité. Cependant, ce réactif ne permet pas la mesure de l'hémoglobine.

[0010] On rappellera que l'hémoglobine est une chromo-protéine contenue dans les globules rouges du sang ou érythrocytes.

[0011] La mesure de la concentration en hémoglobine nécessite donc l'utilisation d'un réactif de lyse cellulaire capable de provoquer la lyse des érythrocytes, afin de libérer l'hémoglobine pour sa mesure.

[0012] Il est connu pour cela d'utiliser des réactifs contenant au moins un détergent et des ions cyanures capables de procéder à la transformation de l'hémoglobine en un composé chromogène pour permettre sa détermination par mesure de colorimétrie.

[0013] Un réactif cyanuré de ce type est décrit dans les Brevets US 3 874 852 et US 3 854 914.

[0014] Toutefois, ces réactifs ont pour inconvénient principal d'utiliser du cyanure. De plus, ils ne permettent pas d'identifier et de quantifier les sous-populations leucocytaires contenues dans l'échantillon de sang à analyser.

[0015] Il est à noter que des réactifs, ne contenant pas de cyanure et permettant la détermination des leucocytes en plus de la mesure de l'hémoglobine, ont déjà été proposés dans l'art antérieur.

[0016] Ainsi, le document WO 96 02841 décrit un réactif de mesure de l'hémoglobine sans cyanure, lequel contient un détergent ainsi qu'un sel d'hydroxylamine. Ce réactif peut être utilisé pour la numération des leucocytes totaux, mais aucune différenciation leucocytaire n'est possible.

[0017] Le Brevet US 5 242 832 décrit un réactif similaire qui permet également une identification leucocytaire partielle. Cependant, ce réactif ne permet pas l'identification des cellules basophiles, mais seulement l'évaluation des lymphocytes, monocytes et granulocytes.

[0018] Le document WO 98 32016 décrit aussi un réactif de ce type. Toutefois, les sous-populations granulocytaires minoritaires, que sont les éosinophiles et les basophiles, ne sont pas identifiées par le réactif décrit dans cette publication.

[0019] L'invention a notamment pour but de surmonter les inconvénients des réactifs connus.

[0020] Elle vise en particulier à procurer un réactif d'analyse hématologique pour la détermination des leucocytes, et en particulier l'identification et la quantification d'une sous-population leucocytaire, que constituent les cellules basophiles, et cela dans un échantillon de sang total.

[0021] L'invention vise également à procurer un réactif permettant notamment la lyse des érythrocytes ou globules rouges, nécessaire à la détermination des leucocytes ainsi qu'à la mesure de l'hémoglobine.

[0022] Elle vise aussi à procurer un tel réactif d'analyse hématologique sous la forme d'un réactif unique, et non pas d'un système de réactifs.

[0023] Elle vise encore à procurer un tel réactif d'analyse hématologique qui ne comporte pas de composés cyanurés.

[0024] En outre, l'invention vise à procurer un tel réactif hématologique convenant tout particulièrement aux automates hématologiques.

[0025] L'invention propose à cet effet un réactif d'analyse hématologique du type défini ci-dessus, lequel comprend essentiellement :

- un système tampon propre à ajuster sélectivement le pH du réactif à une valeur acide, en particulier inférieure à 3 ;
- au moins un détergent de type cationique ; et
- un composé nitrogéné.

[0026] Le système tampon du réactif est un constituant clé car le pH du réactif permet l'identification de la sous-population constituée par les cellules basophiles, lesquelles sont d'un intérêt particulier.

[0027] En effet, du fait de leurs caractéristiques biochimiques, les cellules basophiles sont susceptibles de résister plus longtemps que les autres sous-populations leucocytaires à l'agressivité d'un pH acide. Cette propriété permet donc leur isolement et leur identification, notamment par une mesure résistive.

[0028] Avantageusement, le système tampon est choisi pour que la valeur de pH du réactif soit inférieure à 3, et de préférence égale à 2,4.

[0029] Le système tampon est avantageusement choisi parmi les suivants :

- chlorure de potassium / acide chlorhydrique ;
- acide tartarique / hydroxyde de sodium ;
- acide citrique / hydroxyde de sodium ;
- potassium hydrogénophthalate / acide chlorhydrique ;
- acide citrique / di-sodium hydrogénophosphate ; et
- acide borique / acide citrique / potassium dihydrogénophosphate.

[0030] Les détergents de type cationique exercent une fonction de lyse des globules rouges ou érythrocytes, ce qui permet de libérer l'hémoglobine qui peut être ensuite déterminée par mesure d'absorbance. D'une manière générale, les détergents ioniques (anioniques et cationiques), sont principalement utilisés pour dissocier les complexes protéiques et solubiliser les protéines des membranes. Ils sont dits dénaturants. Leur action est rapide et donc compatible avec les contraintes de cadence spécifiques aux appareils automatiques.

[0031] Le détergent est avantageusement choisi parmi les composés suivants :

- les amines primaires, les acétates et chlorhydrates d'amines grasses ;
- les sels d'ammonium quaternaire et le bromure de triméthylcéthyl ammonium ;
- les amides de diamines substituées, cationisées par le sulfate d'éthyle, la diéthanolamino-propylamine ou le diéthylamino-propylamide ; et
- les amides de diéthylénetriamine cyclisés.

[0032] Le composé nitrogéné exerce essentiellement une fonction de stabilisation physico-chimique des dérivés d'oxydation de l'hémoglobine.

[0033] Ce composé nitrogéné est avantageusement une thiourée, en particulier la 1,3-diméthyl-2-thiourée.

[0034] Le réactif de l'invention peut comprendre en outre au moins un sel inorganique.

[0035] Ce sel, s'il est présent, intervient dans l'activité détergente et permet de maintenir dans les limites de la normalité les phénomènes d'osmose au niveau des membranes cellulaires, ce qui est important pour la détermination des cellules basophiles. Ce sel joue également un rôle dans les méthodes de mesure de résistivité qui sont généralement appliquées dans les automates hématologiques.

[0036] Le sel inorganique est avantageusement constitué par un sel de métal alcalin. En tant que sels utilisables, on peut citer principalement les chlorures ou sulfates de sodium ou de potassium.

[0037] De manière préférentielle, le détergent est présent à une concentration de 0,2-20 g/l et le composé nitrogéné à une concentration de 0,1-10 g/l.

[0038] L'invention sera décrite maintenant en référence à l'exemple non limitatif suivant.

EXEMPLE

[0039] On prépare un réactif d'analyse hématologique à partir des composés ci-dessous, et dans les concentrations indiquées :

Composés	Concentrations
chlorure de potassium	5-10 g/l
1,3-diméthyl-2-thiourée	0,5-3 g/l
dodecyltriméthyl ammonium chlorure	0,5-5 g/l
potassium hydrogénophosphate/HCl	1,0-10 g/l

[0040] Les composés ci-dessus sont mélangés et le pH est ajusté à une valeur acide inférieure à 3, et typiquement de l'ordre de 2,4.

[0041] A l'aide de ce réactif, on procède à des analyses hématologiques sur un échantillon de sang total humain en utilisant un automate d'hématologie.

[0042] Pour cela, on met en contact 10 µl de l'échantillon de sang total avec 2ml du réactif ci-dessus à 35°C.

[0043] On procède à différents types d'analyses en comparant le réactif de l'invention avec un ou plusieurs réactifs de référence.

[0044] Le réactif de référence est une lyse utilisée dans les automates hématologiques afin de reproduire le dosage de l'hémoglobine suivant la méthodologie classique, non automatique, dite de Drabkin. Il s'agit du dosage de la cyan-méthémoglobine.

[0045] Selon cette méthode, le fer ferreux (Fe⁺⁺) de l'hème des hémoglobine, oxyhémoglobine et carboxyhémoglobine contenues dans les globules rouges est oxydé en fer ferrique (Fe⁺⁺⁺) par le cyanure de fer pour former la méthémoglobine. La méthémoglobine se combine ensuite avec des ions cyanure pour former la cyanméthémoglobine, laquelle est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm [Drabkin, J. Biol. Chem. 112:51 (1935)].

[0046] Par contre, le réactif de l'invention est utilisé dans un mode de dosage sans cyanure. L'hémoglobine érythrocytaire est éluee par l'action d'un agent de lyse approprié. Le fer hémique de l'hémoglobine éluee est oxydé par l'action combinée du composé érythrolytique et de l'oxygène dissous dans la solution. La méthémoglobine libre est instable si on la compare à la cyanméthémoglobine. On utilise donc des composés ayant des atomes donneurs d'électrons pour réduire le fer hémique et stabiliser la méthémoglobine.

[0047] Le réactif de l'invention est utilisé pour différents types d'analyses effectuées sur un automate hématologique.

1) Numération des leucocytes

[0048] On procède à une numération des leucocytes ou globules blancs totaux.

[0049] On compare les résultats de mesure obtenus avec le réactif de l'invention et avec un réactif de référence qui ne permet pas de différenciation leucocytaire même partielle.

[0050] La figure 1 montre les valeurs de mesures exprimées en milliers de cellules, d'une part pour le réactif de référence représenté en abscisse, et d'autre part pour le réactif de l'invention représenté en ordonnée.

[0051] Le graphique montre une excellente corrélation entre les deux types de mesures. Les valeurs du coefficient de corrélation ($R^2 = 0,99$) et de la pente de la droite de régression (0,99) indiquent une très bonne corrélation.

2) Différenciation et numération des polynucléaires basophiles

[0052] La figure 2 montre la courbe résultant de l'analyse résistive d'un échantillon de sang total avec le réactif de l'invention décrit plus haut. Cette courbe représente un histogramme de répartition des cellules en fonction de leurs tailles.

[0053] L'axe des x (abscisse) correspond à la détermination des volumes cellulaires (µ³) calculés par une mesure résistive. Les polynucléaires basophiles se situent à droite du curseur central (BAS). A gauche de ce curseur central se trouvent toutes les autres sous-populations leucocytaires non différenciables volumétriquement du fait de la forte agressivité du pH du réactif.

[0054] Dans l'exemple, on identifie des polynucléaires basophiles qui représentent une proportion de 6,2 % (en

volume) par rapport à la population leucocytaire totale.

3) Mesure de l'hémoglobine

5 [0055] On effectue une mesure de l'hémoglobine avec le réactif de l'invention et on compare les résultats de mesures de la concentration en hémoglobine avec le réactif de l'invention et un réactif de référence contenant des composés cyanurés.

10 [0056] La figure 3 montre les valeurs de concentrations en hémoglobine (exprimées en grammes/litre) obtenues par le réactif de référence (représentation en abscisse) et le réactif de l'invention (représentation en ordonnée). Là encore, les valeurs du coefficient de corrélation ($R^2 = 0,99$) et de la pente de la droite de régression (1,09) indiquent une très bonne corrélation.

[0057] Ainsi, l'invention procure un réactif unique qui permet la détermination des leucocytes, l'identification d'une sous-population leucocytaire (en particulier les polynucléaires basophiles) et la mesure de l'hémoglobine, et cela sans utilisation de composés cyanurés.

15 [0058] Le réactif de l'invention présente notamment la particularité de permettre la mesure de l'hémoglobine dans des conditions très acides par rapport aux réactifs connus.

[0059] En outre, ce réactif se présente sous la forme d'un réactif unique, et non d'un système de plusieurs réactifs, et il convient tout spécialement aux analyses effectuées sur des automates hématologiques.

20 [0060] Bien entendu, l'invention n'est pas limitée à l'exemple de réalisation décrit précédemment et s'étend à d'autres variantes de réalisation.

Revendications

25 1. Réactif pour la détermination des leucocytes et des polynucléaires basophiles, ainsi que pour la mesure de l'hémoglobine dans un échantillon de sang, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 30 - un système tampon propre à ajuster sélectivement le pH du réactif à une valeur acide, en particulier une valeur inférieure à 3 ;
- au moins un détergent de type cationique ;
- 35 - un composé nitrogéné.

2. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le système tampon est propre à ajuster le pH à une valeur égale à 2,4.

40 3. Réactif selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le système tampon est choisi parmi :

- chlorure de potassium / acide chlorhydrique ;
- acide tartarique / hydroxyde de sodium ;
- 45 - acide citrique / hydroxyde de sodium ;
- potassium hydrogénophthalate / acide chlorhydrique ;
- acide citrique / di-sodium hydrogénophosphate ; et
- 50 - acide borique / acide citrique / potassium dihydrogénophosphate.

4. Réactif selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le détergent est choisi parmi :

- 55 - les amines primaires, les acétates et chlorhydrates d'amines grasses ;
- les sels d'ammonium quaternaire et le bromure de triméthylcéthyl ammonium ;

EP 1 039 297 A1

- les amides de diamines substituées, cationisées par le sulfate d'éthyle, la diéthanolamino-propylamine ou le diéthylamino-propylamide ; et
- les amides de diéthylénetriamine cyclisés.

5 5. Réactif selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le composé nitrogéné est une thiourée, en particulier la 1,3-diméthyl-2-thiourée.

10 6. Réactif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un sel inorganique.

7. Réactif selon la revendication 6, caractérisé en ce que le sel inorganique est un sel de métal alcalin.

8. Réactif selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisé en ce que le sel inorganique est choisi parmi les chlorures et sulfates de sodium ou de potassium.

15 9. Réactif selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le détergent est présent à une concentration de 0,2-20 g/l et le composé nitrogéné à une concentration de 0,1-10 g/l.

20 10. Réactif selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par la composition suivante :

Composés	Concentrations
chlorure de potassium	5-10 g/l
1,3-diméthyl-2-thiourée	0,5-3 g/l
dodecyltriméthyl ammonium chlorure	0,5-5 g/l
potassium hydrogénophosphate/HCl	1,0-10 g/l

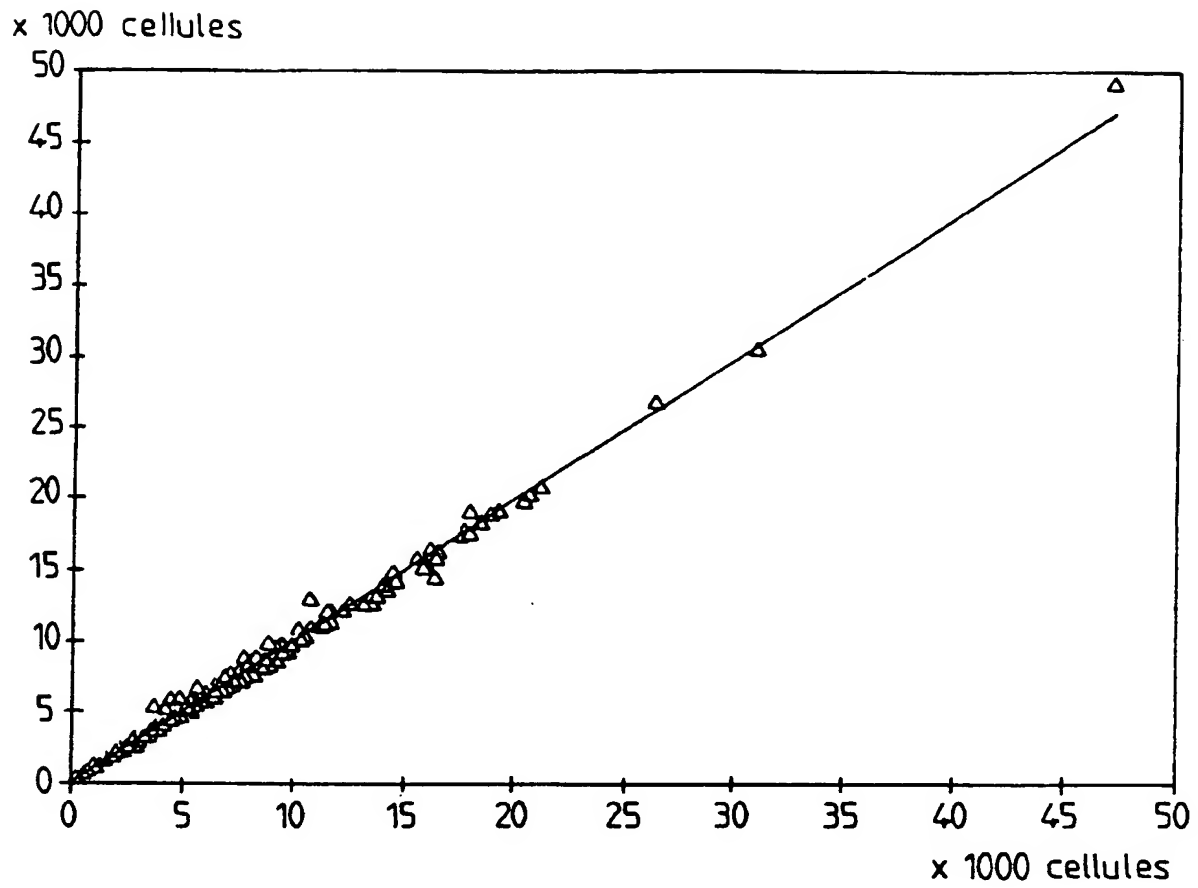


FIG.1

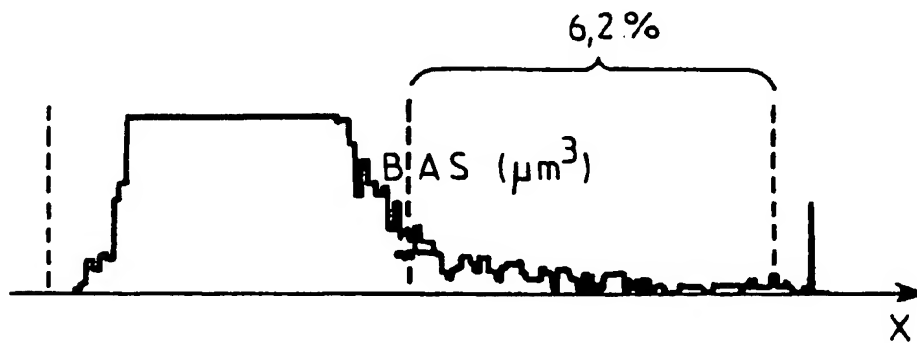


FIG.2

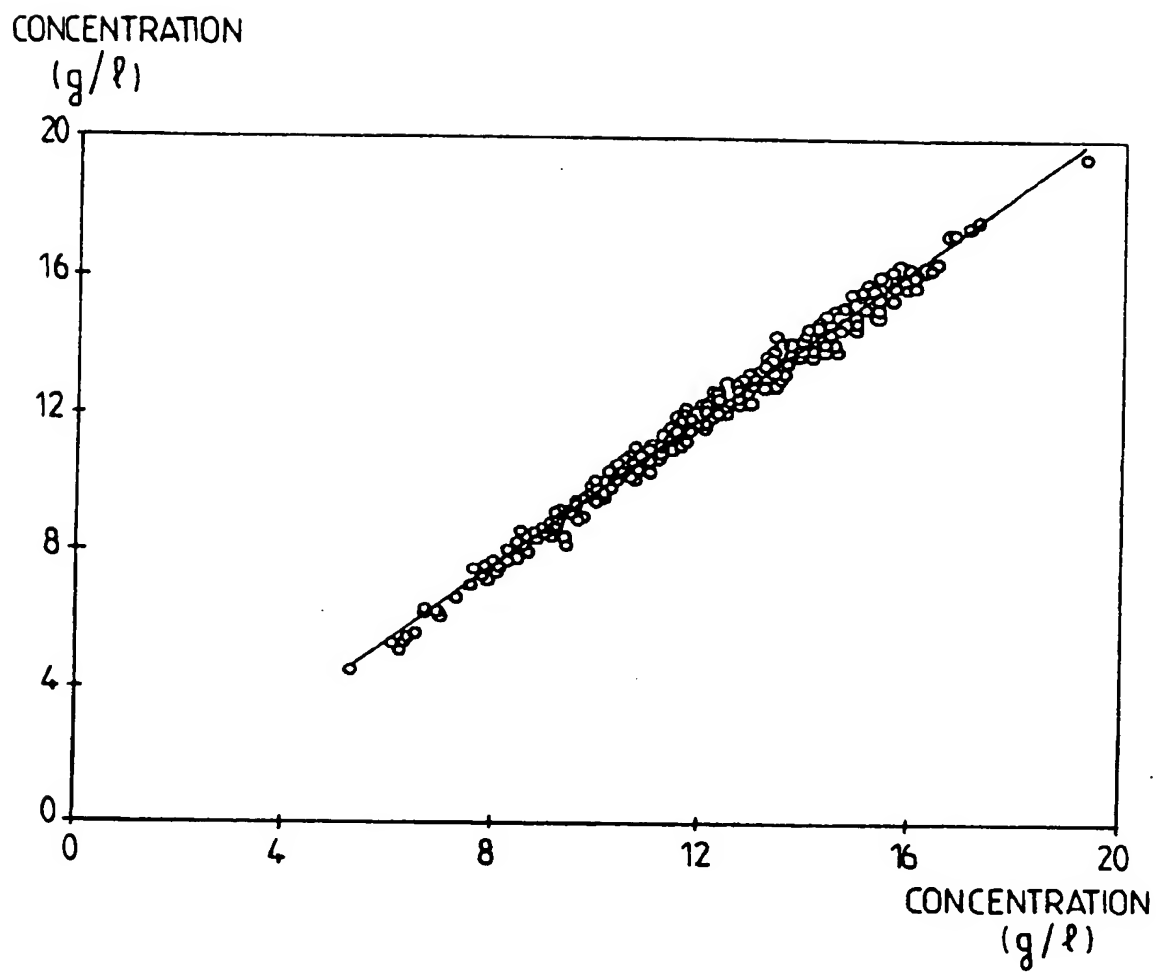


FIG. 3



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 00 40 0670

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.7)
X	EP 0 695 936 A (TOA MEDICAL ELECTRONICS) 7 février 1996 (1996-02-07)	1-4,6-9	G01N33/50
Y	* exemple 1 *	1,5,10	
X	US 4 286 963 A (LEDIS STEPHEN L ET AL) 1 septembre 1981 (1981-09-01)	1-4,6-9	
Y	* colonne 7, ligne 4 - ligne 10 *	1,5,10	
X	EP 0 177 137 A (TECHNICON INSTR) 9 avril 1986 (1986-04-09)	1-4,6-9	
Y	* revendications 1,3,4,6,8-10 *	1,5,10	
X	US 4 617 275 A (MATSUDA NORIAKI ET AL) 14 octobre 1986 (1986-10-14)	1-4,6-9	
Y	* revendications 1-4 *	1,5,10	
Y	EP 0 444 240 A (TOA MEDICAL ELECTRONICS) 4 septembre 1991 (1991-09-04)	1,5,10	
Y	* page 7, colonne 12, ligne 33; revendications 1,2,4 *	1,5,10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.7)
			G01N
D,A	EP 0 442 776 A (ABX SA) 21 août 1991 (1991-08-21)	1-4,6-9	
	* revendications 1-8 *		
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 13 juillet 2000	Examineur Hart-Davis, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : artère-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03 82 (P4/C22)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 00 40 0670

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

13-07-2000

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0695936 A	07-02-1996	JP 8043381 A	16-02-1996
		AU 695767 B	20-08-1998
		AU 2053395 A	15-02-1996
		CA 2151667 A	04-02-1996
		CN 1126836 A	17-07-1996
		US 5677183 A	14-10-1997
US 4286963 A	01-09-1981	AUCUN	
EP 0177137 A	09-04-1986	AU 599005 B	12-07-1990
		AU 4587985 A	10-04-1986
		CA 1255197 A	06-06-1989
		DE 3586159 A	09-07-1992
		DE 3586159 T	21-01-1993
		DK 429285 A, B,	25-03-1986
		ES 547094 D	01-06-1987
		ES 8706263 A	16-08-1987
		JP 1886776 C	22-11-1994
		JP 6008817 B	02-02-1994
		JP 61088896 A	07-05-1986
		US 5518928 A	21-05-1996
US 4617275 A	14-10-1986	JP 1667727 C	29-05-1992
		JP 3033230 B	16-05-1991
		JP 60073356 A	25-04-1985
		US 4656139 A	07-04-1987
EP 0444240 A	04-09-1991	JP 2935529 B	16-08-1999
		JP 3252556 A	11-11-1991
		CA 2027452 A	02-09-1991
		DE 69027593 D	01-08-1996
		DE 69027593 T	28-11-1996
		US 5389549 A	14-02-1995
US 4983375 A	08-01-1991	AUCUN	
EP 0442776 A	21-08-1991	FR 2658300 A	16-08-1991
		AT 121193 T	15-04-1995
		AU 631289 B	19-11-1992
		AU 6994191 A	15-08-1991
		CA 2035793 A, C	14-08-1991
		DE 69108757 D	18-05-1995
		DE 69108757 T	24-08-1995
		DK 442776 T	03-07-1995
		FI 910705 A, B,	14-08-1991
		IE 66742 B	07-02-1996

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 00 40 0670

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

13-07-2000

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0442776 A		JP 4230854 A	19-08-1992
		KR 176253 B	15-05-1999
		NO 301949 B	29-12-1997
		PT 96741 A, B	31-10-1991
		US 5196346 A	23-03-1993
		ZA 9100636 A	27-11-1991
<hr/>			

EPO FORM P0460

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82